



# Antitumor effects of the intravesical instillation of heat killed cells of the *Lactobacillus casei* strain Shirota on the murine orthotopic bladder tumor MBT-2

著者	橋 琢也
内容記述	"2006" Offprint. Originally published in: The journal of urology, v. 166, issue 6, pp. 2506-2511, Dec. 2001 Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (B), no. 2296, 2007.3.23 Includes supplementary treatises Includes bibliographical references
発行年	2007
その他のタイトル	マウス膀胱癌MBT-2同所移植モデルにおける乳酸桿菌 <i>Lactobacillus casei</i> シロタ株加熱死菌体の膀胱内注入による抗腫瘍効果
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/91601">http://hdl.handle.net/2241/91601</a>

氏 名（本籍）	高橋 琢也（山口県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博 乙 第 2296 号		
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>ANTITUMOR EFFECTS OF THE INTRAVESICAL INSTILLATION OF HEAT KILLED CELLS OF THE LACTOBACILLUS CASEI STRAIN SHIROTA ON THE MURINE ORTHOTOPIC BLADDER TUMOR MBT-2</b> （マウス膀胱癌 MBT-2 同所移植モデルにおける乳酸桿菌 <i>Lactobacillus casei</i> シロタ株加熱死菌体の膀胱内注入による抗腫瘍効果）		
主 査	筑波大学教授	薬学博士	幸 田 幸 直
副 査	筑波大学助教授	医学博士	高 野 晋 吾
副 査	筑波大学講師	医学博士	安部井 誠 人
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	河 合 弘 二

## 論文の内容の要旨

### （目的）

*Bacillus Calmette Guérin* (BCG) の膀胱内注入は、表在性膀胱癌の治療および再発予防に有効な免疫療法として広く用いられている。しかし、その有効性が高い反面、播種性 BCG 感染等の重篤な副作用も報告されている。一方、乳酸桿菌 *Lactobacillus casei* シロタ株 (LcS) の強い抗腫瘍効果が、多くの動物実験モデルで証明されており、いくつかの臨床試験においても、LcS の抗腫瘍効果が認められている。特に LcS の生菌製剤の経口投与により、表在性膀胱癌の経尿道的切除 (TUR) 後の再発が有意に抑制されることは、注目すべき知見である。

本研究は、マウス膀胱移行上皮癌細胞 (MBT-2) の同所移植モデルを用いて、LcS 加熱死菌体 (LC9018) の膀胱内注入による抗腫瘍効果を確認し、BCG の代替薬となる可能性について検討した。

### （対象と方法）

#### 1. LC9018 の膀胱内注入による抗腫瘍効果

MBT-2 細胞を C3H/He マウスの鼠径皮下で継代維持し、得られた腫瘍塊より MBT-2 細胞懸濁液を調製した。C3H/He 雌マウスの膀胱内に 0.1N HCl を注入し、膀胱粘膜に傷害を与えた。その 45 秒後に 0.1N KOH による中和および洗浄操作を行った。これらの前処理の 6.5 時間後に  $1 \times 10^6$  個の MBT-2 細胞を膀胱内に注入した。

LC9018 (500 $\mu$ g) または BCG 東京 172 株 (500-2000 $\mu$ g) を MBT-2 同所移植の翌日から 1 日 1 回、10 日間連続でマウスの膀胱内に注入した。MBT-2 の移植後 21 日目に膀胱を採取して重量を測定し、腫瘍の出現を比較した。

## 2. 菌体 (LC9018 または BCG) と MBT-2 細胞との混合皮下移植による抗腫瘍効果

LC9018 菌体または BCG 菌体 (各々 100-1000 $\mu$ g) を MBT-2 ( $5 \times 10^5$  個) と混合してマウス鼠径皮下に移植した。移植 21 日目の腫瘍を採取し、重量を比較した。

## 3. LC9018 の膀胱内注入による抗腫瘍効果の作用機作

MBT-2 同所移植の翌日から LC9018 (500 $\mu$ g) を膀胱内に連続注入し、膀胱粘膜局所における抗腫瘍性サイトカイン (TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$ ) の mRNA 発現を RT-PCR 法で調べた。また、膀胱粘膜局所への免疫担当細胞 (好中球およびマクロファージ) の浸潤等を免疫組織化学染色法で調べた。また、*in vitro* で LC9018 菌体または BCG 菌体を脾臓細胞と共培養し、培養液中のサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-12 および IFN- $\gamma$ ) 産生量を ELISA 法で測定した。

### (結果)

#### 1. LC9018 の膀胱内注入による抗腫瘍効果

対照群の腫瘍出現率は 41/58 (71%), 平均腫瘍重量は  $146 \pm 183$  mg であった。LC9018 の膀胱内注入により腫瘍出現率は有意に低下し (8/38 (21%),  $p < 0.001$ ), また、平均腫瘍重量は  $37 \pm 49$  mg ( $p < 0.001$ ) であった。一方、本同所移植モデルにおいて、BCG は有意な抗腫瘍効果を示さなかった。

#### 2. 菌体 (LC9018 または BCG) と MBT-2 細胞との混合皮下移植による抗腫瘍効果

LC9018 により MBT-2 皮下腫瘍の出現率および腫瘍増殖は強く抑制された。また、BCG も有意な抗腫瘍効果を示したが、その効果は LC9018 よりも弱かった。

#### 3. LC9018 の膀胱内注入による抗腫瘍効果の作用機作

LC9018 の膀胱内注入により、膀胱組織における IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の mRNA の発現が上昇した。また、膀胱腫瘍中に浸潤した好中球の周囲に多数のマクロファージが観察され、これらのマクロファージが LC9018 菌体を貪食している像を認めた。

### (考察)

LC9018 による抗腫瘍効果の作用機作は、次のように考えられる。LC9018 の刺激により好中球やマクロファージが膀胱粘膜に浸潤し、活性化されたマクロファージが TNF- $\alpha$  や IL-12 等のサイトカインを産生する。TNF- $\alpha$  は腫瘍細胞に対する直接的な抗腫瘍効果を示し、IL-12 は Th-1 型リンパ球刺激を介して IFN- $\gamma$  の産生を促す。さらに IFN- $\gamma$  が NK 細胞や細胞障害性 T 細胞を活性化し、マクロファージの抗腫瘍活性をさらに増強すると考えられる。BCG との抗腫瘍活性の相違は、細胞性免疫系の活性化能の違いによると考えられる。

LC9018 は LcS の加熱死菌体であり、極めて安全性が高い。この利点を生かして TUR 直後から LC9018 を膀胱内に注入すれば、TUR 時に膀胱内に遊離した癌細胞の生着や残存した癌細胞の増殖阻止が可能となると考える。

### (結論)

LC9018 の膀胱内注入による抗腫瘍効果は、膀胱粘膜局所における細胞性免疫機能の増強により発揮されたと考えられた。表在性膀胱癌の再発を抑制する上で、LC9018 の膀胱内注入は、副作用を軽減した強力な免疫療法になる可能性がある。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、マウス膀胱移行上皮癌細胞の同所移植モデルを用いて、*Lactobacillus casei* シロタ株の加熱死菌体の抗腫瘍効果を、その膀胱内注入によって検証したもので、現在、膀胱癌の治療に用いられている *Bacillus Calmette Guérin* の代替薬となる可能性を示した。これにより膀胱癌治療における投与薬物の選択肢が広まり、今後のより副作用の少ない効果的な治療につながるものと評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。